

NUCLEIC ACID PROBES**Publication number:** JP4501959T**Publication date:** 1992-04-09**Inventor:****Applicant:****Classification:****- International:** C12Q1/44; C12N16/10; C12Q1/48; C12Q1/68; G01N33/543; C12Q1/44; C12N15/10; C12Q1/48; C12Q1/68; G01N33/543; (IPC1-7) C12N15/10, C12N15/11, C12Q1/44; C12Q1/48, C12Q1/68**- European:** C12N15/10D; C12Q1/68A6, C12Q1/68B; C12Q1/68B10, C12Q1/68D4, C12Q1/68D6, C12Q1/68E; G01N33/543D4**Application number:** JP19880501005 19881121**Priority number(s):** GB19880027157 19881121, GB19880027158 19881121, GB19880027159 19881121; GB19880027160 19881121; GB19880027166 19881121; GB19880027167 19881121, GB1989006643 19890322**Also published as:**

- WO9006045 (A3)
- WO9006045 (A2)
- EP0446260 (A3)
- EP0446260 (A2)
- EP0446260 (A0)

[more >>](#)[Report a data error here](#)

Abstract not available for JP4501959T

Abstract of corresponding document [WO9006045](#)

Monodisperse, superparamagnetic particles carrying a plurality of molecules of an oligonucleotide are disclosed and may be used inter alia for sequencing single stranded nucleic acids. The oligonucleotides may be covalently attached or affinity bonded to the particles either by their 3' or 5' termini. The particles have a specific gravity in the range 1.1 to 1.8 and are 1 to 10 microns in diameter. A kit for the isolation and/or processing of target nucleic acid is also disclosed.

Data supplied from the [esp@cenet](#) database - Worldwide

⑥日本国特許庁 (JP)
⑦公表特許公報 (A)

⑧特許出願公表
平4-501959

⑨Int.Cl.
C 12 N 15/11
C 12 Q 1/44

登録記号
ZNA

厅内整理番号
6807-4B※

審査請求未請求
予備審査請求有

⑩公表 平成4年(1992)4月9日
部門(区分) I (1)

(全 16 頁)

⑪発明の名前 技能プローブ

⑫特 権 平2-581005
⑬出 原 平1(1989)11月21日

⑭翻訳文提出日 平3(1991)5月21日

⑮開 出 類 PCT/EP89/01419

⑯國際公開番号 WO90/06045

⑰國際公報日 平2(1990)6月14日

優先権主張 ①1988年11月21日②イギリス(GB)③8827157.2
④1988年11月21日②イギリス(GB)③8827158.0

⑪発 明 者 ホーンズ、エリック
⑫発 明 者 コースネス、ラース
⑬出 願 人 ダイナル・エイ・エス

ノルウェー國、ヌー-0283 オスロ 2、リルアケロン 9ビ-
ノルウェー國、ヌー-0375 オスロ 3、モノリツトベイエン 12
ノルウェー國、ヌー-0212 オスロ 2、スコーエン、ビー・オ
ー・ボックス 158

⑭代 理 人 弁理士 山崎 行造 外2名
⑮特 定 国 A T(広域特許), A U, D E(広域特許), C H, C H(広域特許), D E(広域特許), E S(広域特許), F R(広域特許), G B, G B(広域特許), I T(広域特許), J P, L U(広域特許), N L(広域特許), N O, S E(広域特許), U S

最終頁に続く

圖案の記載

- オリゴタクレオチド分子を複数持した、單分散、複合遺伝子。
- オリゴタクレオチドがジ-アミノ酸を介して既存に共有結合している、請求の範囲第1項に記載の粒子。
- 粒子がポリアクリル酸又はポリメタクリル酸のコーディングを有し、オリゴタクレオチド上のジ-アミノ基との反応によってジ-アミド基を形成するカルボキシル基を与える、請求の範囲第2項に記載の粒子。
- オリゴタクレオチドがジ-アミノ酸を介して既存の複数の氨基酸結合している、請求の範囲第3項に記載の粒子。
- オリゴタクレオチドが、粒子上のアビシン又はストレブトアビシンに結合するD-ビニル基によって粒子の周囲に結合している、請求の範囲第4項に記載の粒子。
- オリゴタクレオチドが、粒子表面上のヒドロキシル基に結合する3'-ヒドロキシル基によって粒子と共に結合している、請求の範囲第5項に記載の粒子。
- 既往がトノエニ1.1の範囲内である、請求の範囲第6項に記載の粒子。
- サイズ範囲が1乃至14ミクロンである、請求の範囲第7項乃至第9項のいずれか1項に記載の粒子。
- オリゴタクレオチドが15万至300萬の複数の糖鎖を有している、請求の範囲第10項乃至第12項のいずれか1項に記載の粒子。

か1項に記載の粒子。

- オリゴタクレオチドがポリAである、請求の範囲第1項乃至第9項のいずれか1項に記載の粒子。
- オリゴタクレオチドが、複合体質のDNA又はRNA配列と特異的に結合する、請求の範囲第1項乃至第8項のいずれか1項に記載の粒子。
- オリゴタクレオチドが、複合体質の他の特異的配列に結合する、請求の範囲第11項に記載の粒子。
- オリゴタクレオチドが標的抗原に対しハイブリッド形成する配列及び、粒子に結合した、相同エンドタクレアーゼ削除部位を含むリンクマー配列を含む、請求の範囲第1項乃至第11項のいずれか1項に記載の粒子。
- 標的抗原を不活性化し、同型抗原を免疫中で請求の範囲第1項乃至第11項のいずれか1項に記載の粒子と結合させ、粒子上のオリゴタクレオチドを前記削除部位上のタクシオチドに對してハイブリッド形成させる方法。
- 標的抗原がDNRAであり、粒子をその免疫細胞に表面に露出させ前記削除から分離する、請求の範囲第12項に記載の方法。
- 前記粒子上に不活性化した標的抗原に、2つのプライマーのうちの1つとしてオリゴタクレオチドプローブを使用するポリメラーゼ連鎖反応による複雑検出を施し、ここで用ひるオリゴタクレオチドプローブを複数し大粒子がまことに存在しているか又はその複数個として、

特許平4-501959 (2)

情報を可能にするのに十分な量の前記プライマーを用える、請求の範囲第1項に記載の方法。

(2) 一重鎖核酸の配列検定方法であって、
(i) 配列検定するオリゴヌクレオチド(DNA又はRNA)を遮断した通常形態半分子子を調製する工程、
(ii) (i) 増子を4つのアリコートに分割し、各々のアリコートに、ボリメラーゼ、脱酰ヌクレオシドトリホスフート、及び1つのジデオキシヌクレオシドトリホスフートを添加する工程であって、ここでジデオキシヌクレオシドトリホスフートは各アリコート間に異なり、プライマーが必要であれば、プライマー又はヌクレオシド又はジデオキシヌクレオシドの少なくとも1がラベル付けされている工程か又は、
iii. 全増子に、ボリメラーゼ、脱酰ヌクレオシドトリホスフート、それぞれ異なったラベルを有する4つの異なるジデオキシヌクレオシドトリホスフート、及び、必要であればプライマー、を導入する工程、
を行うことによって、それぞれ異なった結果と肯定のジデオキシ基をともなった変異を有する、一連のラベル付けされたDNA鎖を合成する工程、
(c) ラベル付けされたDNA鎖を連続させ、大きさ毎にそれを分別する工程、及び

は組合結合させる、方法。

(1) オリゴヌクレオチドを、

(i) オリゴヌクレオチド上のビオチンと核子上のアビシン又はストレブトアビシンとの反応
(ii) オリゴヌクレオチド上のDTAアミド基と核子上のカルボキシル又はトリオキシ基との反応
(iii) ヒドロキシル又はプロテクトされたヒドロキシル基を有する核子上でのオリゴヌクレオチドの還元化反応

によって結合させる、請求の範囲第1項に記載の方法。

(i) 配列を検定する工程、
を含む方法、
(ii) 相互作用を単離及び/又は掩蔽するためのキットであって、
(iii) 請求の範囲第1項に記載の電子粒子、及び以下に記載の：
(1) ポリメラーゼ
(2) 逆転写酵素
(3) 制限エンドヌクレオチダーゼ
(4) 過酸化水素酶
(5) デオキシヌクレオチドであって、そのうちのいくつかがラベルを保持しているか又は保持するように適合されているもの
(6) デオキシヌクレオチドであって、そのうちのいくつかがラベルを保持しているか又は保持するように適合されているもの
(7) オリゴヌクレオチドであって、そのうちのいくつかがラベルを保持しているか又は保持するように適合されているもの
(8) 簡便的PCR (i) プライマー及び/又は3'-プライマーであって、ラベル付けされていてもよいもののうちの少なくとも1つを含む、キット。
(ix) 請求の範囲第1項に記載の電荷性粒子の製造方法であって、所定により最初の官能基を有するオリゴヌクレオチドを、粒子の表面に它の基又は分子に共有又

明　細　書

摘要　アーロード

本発明は新規な複数プローブ及びそれらを調製し使用するための方法及びキットに関する。

相應の生物活性操作においては、特定の複数物質を複合化合物から單離しこれに非常に近似的なプローブを造ることが望ましいことが多い。現行 (current) 技術の十分に長い歴史が知られている場合、その能力に過剰的にハイブリダイゼーション、その複数の局所及び/又は局部に使用することができるオリゴヌクレオチドを設計することが特に有用であることが判明した。等に、そのようなプローブを不適切して、複数検査を含む複合複合物との結合の際に標的基が過剰に不純化され、残って分離されるようになることがある。

以前より、オリゴヌクレオチドを複数粒子に結合させることが検討されている〔例えば、アドバンスト・マグネティックス (Advanced Magnetic) の米国特許第 4332410 号、アココ・コーポレーション (AccoCo Corporation) の欧州特許第 265311 (号)〕。しかしながら、これらは決して複数ではなく、通常、複数を平均浓度まで被給付され、その後、オリゴヌクレオチドを含む固形の混合分離の範囲への結合を可能にする基板をもたらす物質で被覆された微細ななら枝葉状の。さらに、このような複数粒子は特に自動化された実験室では複雑がなく、操作上好ましくないことが証明されている。

特に、離液中に上って被覆された細胞個体は子はしばしば選択的凝集に不適切に感応し、かなりの割合が結合した液体分子とともにアスペクション中に凝集し、同時によりも少ない液体分子の単離しか行われないことが判明している。本発明は、甲分離通常細胞 (isolated cell) 1000-10000個/mlの粒子が同時に被覆された細胞粒子よりも大滴に清浄度が高いということの発見に基づくものである。

本発明によって、本発明者は、複数のオリゴヌクレオチドの分子を用意した樹脂表面を更に粒子を固定する。

本発明の粒子は、目的一直線状態に制するハイブリッド形態のグループとして使用でき、また前記オリゴヌクレオチドの改善剤別液滴を可能にすることにも利用できる。

オリゴヌクレオチドは一量體からであるのが好ましいが、それはこれがRNAsと一量體RNAとの両方に對してハイブリッド形成し、かつRNAsよりもかなり安定だからである。このようなRNAsには、オリゴ-1（これは虫草真菌のRNAs上に普遍的に存在するオリ（A）「テール（tail）」とハイブリッド形成する）及び單純RNAs及びミトDNAs分子中の特定の尾端とハイブリッド形成する特異的DNA配列が含まれ、又は固着配列固定化のDNA分子でもよい。各プローブは、オリゴ-1又は特異的DNA配列でよい一量體DNA配列が複数粒子に直接結合したものから成ることができるが、

別の特徴は、複数粒子を作用して行われるハイブリッド形態又はその他のいかなるプロセスも、同様を對いて粒子を選択的に活性させ、粒子上の物質についてか又は上溶液中の物質に結合せしむるレベル (level) を分析することによって、逐段的にモニターアすることが容易であるといふことである。

選択的凝集を適用することによる粒子の分離は、核酸又は蛋白質を活性化する可動性のある界面力を生じる遠心分離のような従来的な分離技術よりさるかに優やかである。

固着粒子は半分数でありかつ超常活性であり、これらの場合、粒子が含まれる液滴の濃度間に大きく寄与する。粒子に被覆されたプローブが種々の反応において溶液中で活性的になると同時に凝集であるかのように強く反応することは、本発明の最も大きな利點である。従って、例えば、複数粒子を固定する細胞表面から細胞質内の企図酵素を約15分以内に行なうことが可能だが、これに新しアフィニティカラム (affinity column) を使用すると多時間である。半分数粒子、即ち、ほぼ同じサイズを有する粒子、を使用することによって、既述過度及びその他のパフォーマンスは特に高いである。複数固着粒子（即ち、永久母性を維持するのに必要な磁区 (magnet) の大きさよりも小さい過度粒子のサブ粒子を含む粒子）を使用することによって、反応中の粒子の凝集 (coagulation or clumping) を防ぐことができ、且つ、

発表平4-501959(3)

DNAの二重鎖部分を介して複数粒子に結合していくよい。本明細書中で使用される「オリゴヌクレオチド」という用語は、由來及び自生のある複数のDNA及びRNAの配列を包含する。

オリゴヌクレオチドの組成はRNAs (RNA) が好ましく、RNAsは組成がどちらか好ましい。オリゴ (O) 配列と、純度の問題では、純度既存細胞（真核又は原核）とを含むプローブオリゴヌクレオチドは、市販のリボルセ或製造、例えばアプライド・バイオシステムズ・インク (Applied Biosystems, Inc.) (CA, USA)、フォースクエーションティー・リンクーンセンタードライブ (FSD) 型の各装置、のいずれかを作用することによって最も好適に調達することができる。

本発明によるプローブは、一般に、標的核酸の單純とその他の化学的及び物理的性質による操作において使用される。

複数粒子を復活することによる繋つかれの割合は明らかに確立している。複数粒子は、標的核酸を含む複合物、例えば陰陽エキス、に添加され、洗浄され、そして最終的にリサイクル (recycle) の一方の側に引き寄せると、複数はその後不要な成分とともに除去でき、そして、結合したRNAsを育する活性化不活性溶液中に再分散できる。操作工程はそつぎばやに巡回繰り返すことができる。標的核酸を導入した工程を15分以内で行なうことができる。

これもまた同一かつ高い活性濃度を確実にする。従って、粒子は液槽をかけによって液槽上に均一な浓度で容易に複数させることができるが、例えば物理的振舞によつて、その他の液槽用に容易に再分散させることができる。反応の初期及び終末の均一化槽を複数化への道をもたらし、このことは、工具用器具及び又は工具用プロセスにおいて重要な多くの成績操作の必須要件である。最小限の入出の介入しかともなわない複数の機械によって、反応及び分離が完全な信頼性をもつて行えるということは最も重要な事である。

本発明において使用するのに好ましい固着粒子体、杭州物語 (1991) 1号【シンテック (Synthetic)】に従って製造される半分数固着液滴粒子であり、この引出の請求は本明細書中に含まれる。これらの粒子中には、液滴に均一に分散しており、液滴に対する比率は均一な液滴をもたらし、これによって全ての粒子が同じ速度で移動するので、高活性のある方法、特にガートマーチン、を駆使する際に適切である。さらに、液の再循環のある量が各粒子に組み込まれているので、これを、以下で説明する液槽の粒子の比率を可能にする比較的低い濃度に調整することができる。従来の、規則性の方針した生成物においては、小粒度は、選択性が付されると時にブレーキカット (break-off) を行なう場合には少なず多く残しがかかるでないか、あるいはその液槽の比率はより大きな粒子へ集中ましくない効率を生じさせる。複数の自動化さ

これらの薬剤は、仔子を皮膚表面に保持し、一方母液は流れていかせるのに、塗布を復用している。この他の薬剤で使用するためには、既往性子の均一な田畠地及び乾燥遮光性質は必須のものである。

本明細書中に用いて使用される「平均粒」といふ用語は、5号球の表面積を有するナイン分量を意味するものである。

1.1 乃至1.10の比を有する粒子を使用するのが好ましく、1.1乃至1.10の比が特に好ましい。本发明に就いて使用される单分散粒子において、比量はここでも特に拘りでない。拘りで予想可能な程度的制限をしたらば、

单分散粒子は、少なくとも1ミクロン、多くは少くとも2ミクロンの粒径の均粒粒子であるのが普通であり、50ミクロン以下、多くは6ミクロン以下、同丸は約1ミクロンの直径であるのが好ましい。粒子が小さくなればなるほど比表面はやっくになり、比表面時間が反応時間に匹敵するほど長くなることもあり、残って物質的属性の必要性を有する。しかしながら、粉末技術で使用されているような、ずっと小さい底辺の微細粒子を含む平均粒度はせいぜい乃至1.5ミクロンの粒子群、過細への発達においては問題があるうには行動しない。

プローブの粒子への結合は、直接的化学結合基団にストレートアビアン(straight-chain)アセタサン(acetan)結合などによる疏水結合でよい。

細孔を擴大し表面に貯留する酵素を導入するためには、網のセグメントを細孔や及び表面で重合させる。好ましい樹脂の粒子の組合、逆は、-(CH₂CH₂O)_n-化合物を組してオリマー-空洞に形成している一部群を有する。その他の好ましい粒子は、メタクリル酸の重合によって得られた一二次群を有する。

さて、例えば、粒子中に初めてから存在しているHCl基を、歩留率が100%で除去されているようにタエボキシドと反応させ、その後メタクリル酸と反応させて中間ビニル基を残してもよい。メタクリル酸との接着剤混合は、必ずで宮元するHCl粒子のような、水酸化アルカリ性基を有するオリマー直鎖を出じる。同様に、HCl、LiCl、及びLiOHビーズのようなジエボキシドとの反応の上生成物をジアミンと反応させることによってアミノ基を導入することができ、一方HCl及びLiOHビーズのように、アミノゲリセロールのようなヒドロキシンアミンとの反応はヒドロキシル基を導入する。

ダイナビーズ (Dinabedz) は「既存 (エスリクション)」
 (これはノルウェー、オスロのダイナル社から販売される)
 は、牛乳昔ヨガキシドで発酵されており、エコキシ酸を
 ヒドロキシ酸の混合物をもたらす。しかしながら、水と
 の接触がエコキシ酸をヒドロキシ酸に転換する。

ダイナビーズ 2-1316《健康 おとこクロシ》は、オードル
エンスル由ニルクロリドとの反応によってトシリキシ酸
(TANIC ACID)に変化されているヒドロキシル基を有

持表号4-501959(4)

グループの結合用に、活性性子は、ヒドロキシル、カルボキシル、アルデヒド、又はアミノ基を樹示してよい。一般に、これらは、被膜されていない半分触媒性酸素原子を有して、上述の官能基のうちの一つを有するポリマーの表面を覆することによって付けられ、ポリマーの側は、ヒドロキシル基を有するためのポリジリコールをともなうオザリカレタン、ヒドロキシル基を有するためのセルロース誘導体、カルボキシル基を有するためのアクリル酸又はメタクリル酸のポリマー又はコポリマー、アミノ基を有するためのアミノアルキル化ポリマーなどである。米国特許第3,616,814号は、このような表面被膜をなくせしめている。

するボリスチレンビーズである。

上記のタイプの官能化された並頭を使用することによって、日本人及びノルマズアフリカの雄性異性結合が容易に近くなり、併に、カルボキシル化ビーズの着色にそうであることを本研究者らは認めた。

ハイブリッド形成したDNAと次にヒトDNA結合に使用する場合、プローブと2'アミンカーボンルボキシル基を介して選択性子と結合しているのが好きしく、このDNAは同時にD-アラニン基が費耗され、これはカルボジイミドカーボンルボキシル剤を用いてカルボキシルとアミド結合を形成させることができ。コトAのD-結合は、D-アラニノDNAと固定するようにD-結合されたヒドロキシル基と結合子を作用して行うことからも

オリゴヌクレオチド N-DNA の上、結合もまた化学的合成によって行なうことができる。ここでもまた单量性核酸の半常に唯一の監督は、ジーン・アクシングラー (Gene Axelson) [ファーマシア (Pharmacia, U.S.A.)] のような自動化された合成装置中の合成に特に適する唯一な反応装置をもたらす。合成装置は、初めてヒドロキシル基又はプロテナツキれたヒドロキシル基を導入されることが可能とする。ダイナル (Dial) 型のダイテビーズ 11-166 はこの目的によく適合する。しかしながら、当要な場合には、カルボキシルのようなセミ油の墨面荷電基を導入してヒドロキシル基を有するリンカーリー又は D-核苷ヌク

レオチドを結合させることができる。

ジ・結合目、ジ・アミノーカラゴマクレオチドのトルコ酸化還元粒子へのカップリングによって行ってもよい。トルコ酸化還元粒子は、ダイナルル^{1/2}回のダイナビーズ R-311のようなヒドロキシル化還元粒子をトルコ酸化することによって製造できる。トシロキシ基の置換は、菌体粒子に直接結合したジ・アミノ酸を接着する。

しかしながら、プローブがR-RNAの端部にのみ使用される場合に、プローブのD-RNA端が還元粒子に結合してもよく、これは、DNAのD-キヌクレオチド基と粒子上のアミノ基の間にホスホルアミド結合を形成させることによって順序に行うことができる。

ビオチンラベルされたリクレオチドは市販されているので、DNA断片のD-RNA端はDNAポリメターゼを接着して断片にラベル付けでき、これらは、例えばヒドロキシル基を介して還元粒子に結合しているアビアンヌはストレートアビシンに簡単に結合できる。ビオチンラベルは、1つ以上のオーアミノカブリン酸部分のような、スペーサーーム [Ile(Ile)-Gly] によって、タグレオチドに結合させて立体障害を最小化できる。逆って、例えば、二重鎖プラスミドが粗面部分で切断され、外観のD-RNA端にビオテインを結合するように、その末端にヒドロキシル化されたタグレオチドを付けることができる。酸化されたD-RNA端のD-RNAが、その後、利の細胞内で切断されると場合、二重鎖D-RNAの部分は切断され、ストレ

車発明による、オリゴタグレオチドを抱持している複合性半分段子は、技術の方法において使用できる。これらのいくつかを以下に記載する。

1. 細胞内を含む混合物からめのR-RNAの切断

粗細胞抽出液からR-RNAを落す簡単な方法は、ディーハニカルチス (T. Hincman) らによって示されている【セルカルチャー・クローニング (Cellular Cloning)】、ラボトリー・マニュアル (Laboratory Manual) 、111 - 112 - 113ページ】。簡単に説べると、オクタキシタグレオチド (オリゴ-D) 又、脱酰セマトリックス、典型的にはカラム、をはじめに使用されるアガロースビーズ又はセルロースに結合させる。粗細胞抽出液をカラムに通し、細胞エキスがカラムを通過するにつれて、R-RNAをポリアデニレートテール (polyA) がビーズ上に不動化されたオリゴ-Dに結合する。カラム洗浄し、その後の洗浄液カラムから洗出させる。しかしながら、通常少なくとも数時間というそれは必要な時間のために、この方法は強烈からほど高い。

R-RNAの全ての種は、細胞溶解液中に存在するオリゴタグレオチドによって急速に粗末分解する傾向にあるので、細胞の溶解液であるだけ速やかに中和し、cDNAに遮蔽することが重要である。そうしないと、細胞内のみならず割合が劣化し、完全な還元子のDNAに対応する全長のmRNAの比率を定めあわ

特許平4-501959 (5)

プロアビシンラベルされたビーズに結合する可能がある。ビオチル化されていない膜を除去するとビーズに結合した、ビオチンの結合したタクシオチドが残る。

一般に、粒子を質疑化し、その他のプローブを結合させるのが有利であり、活性粒子は10¹ ~ 10²のプローブを有する。(1 ~ 100 fmol/μl)。活性粒子の均一なサイズは、プローブが粒子と反応する初期一波プローブ密度を最大にする点で有利である。均一なプローブ密度は、全てのプローブが、それらが作用される確率を半端において実質的に同じようになることを実現する点で重要である。

酵素活性が、粒子の表面に非常に近いところ、例えばアベース (Aviase) 腹内、で起こるようであることは、本発明の重要な特徴である。既って、もし酵素が酵素であるようセリンキーリン列中に存在し、かつプローブがその酵素アミナートとして作用される場合、(1)R-RNAと既てR-RNAを、DNAポリメターゼによって酵素位を絶えて粒子表面に向かって合成でき、逆って、それを適当なエンドヌクレアーゼによって断片に切断できることが判明した。本発明のカルボキシル化された粒子の最も、粒子のミクロ表面が非常に不規則であり、ハイブリッド形成とその表面近くでの酵素活性に対する立体障害を経減できるよう必要常に大きな表面積を形成させていることが判明した。一方、このようなカルボキシル化された粒子への非特異的結合は増加しない。

が問題になる。細胞エキスからmRNAを分離する従来的方法を使用すると、mRNAがカラム上にいる間に多くの始端が脱やされ、認知しくない変化をもたらす。さらに、アガロース又はセルロースのカラムは汚染され、既ににさるにその他の細胞成分によって詰まり、容易に再利用できない。

本発明の目的は、mRNAを導き得る簡便な方法を提供することである。

本発明の別の特徴によれば、R-RNAをその他の成分とともに含有する複合からR-RNAを分離する方法であって、

- (1) 分離したオリゴタグレオチドプローブを用する複合の粗細胞半分段子を粗面液体に溶解し、それによってR-RNAを脱脂プローブに付しハイブリッド形成させて細胞粒子に結合させる工程、
- (2) 細胞粒子を固体表面に懸念的につけて分離する工程、及び
- (3) 液体とその他の成分を精選した粒子から分離する工程、

を含む方法が提供される。

認知しくないR-RNAのランダムなハイブリッド形成を防ぎ、ハイブリッド化荷物の量りの部分の除去を完全にするために、活性粒子は最初の酵素的分離の後少なくとも1回洗浄するのが好ましい。ランダムな部分用によって粒をされたR-RNAを除去するために、こ

特許平4-501959(6)

の浓度はストラクションシート (Stratton sheet) 条件下で、DNAを上昇させるか又はハイブリッド化中に使用するのよりも低い増強度、例えば、0.5%の省化ナトリウム又は過量透達 (excessive solution)、を使用することによって行ってもよい。

ストラクションシート (Stratton sheet) は通常プローブの長さとそれを含む端によって計算される。プローブオリゴメクレオチドを標的のDNAの端の端 (base pair) が不正確である場合、端子は比較的小さいストラクションシート条件下で行うべきである。一般に、端子は、2端 (termini) の端点 (tip) よりも少し低い位置で行われる。大体の場合は、上述のマニフェスの文献の 111~119頁からの以下の説明に従って簡単に計算できる。

(c) $T = \frac{L}{2} + \frac{L}{4} + (E + D) + 0.5$ ピー

これはオランダでのプローブの平均長さに等しい。
(d) この2端DNAのTは、次で組み合わされた端點の数が10倍増加することによって下がる。

(e) $T = \frac{L}{2} + \frac{L}{4} + 10(E + D) + 0.5$ ピー

ここで、E 及び D は2つの端部のイオン強度である。

小さいオリゴメクレオチドに対しては、この算式は以下のようにての単位で近似できる。

$T = 2 \times (E + \text{端点の数}) + 0.5 \times (D + \text{端点の数})$

ハイブリッド化適応は、上記化ナトリウム透達又は本技術分野で公知の過量透達中で行うのが好ましい。

[オクレック・アンド・ハイブリダイゼイション (Olekrik & Hibrilization)、ピー・ティー・ハイムス (P.T. Heimes) 及びルス・ジュー・ヒギンズ (R.S. Higgins)、アイアルエル・グレス (IEL Gres)、1983、を参照のこと]。

プローブからのDNANの除去は、複数な操作法、例えば、1~10EL、中において何で簡便化することによって行うことができる。

水洗脱の方針は、特定のDNAN分子の分離の前の手順精製工程としてのように、核酸溶解からその他のDNAN他のDNAの分離に用意することができる。この目的のために、プローブはオリゴ-E、即ち、例えば、DNA 300端基 (tip)、斯くして15乃至30端基のよう、比較的長いオキシチミン単位の端、であるのが好ましい。このような端は、オキシチミンの異常結合度合い、より短い端に對しては、縮合されたDNA合成又は変形的重合によって、容易にかつ安価に調節することがある。

オリゴ-E は洗脱又は緩和結合によって粒子に直接的に結合できる。この場合、ハイブリッド化されたDNANはその後加熱によって溶解し、既述の原液液中所含の濃度のDNANの混合物を与える。

この実験操作中の特別の利点は、もしそれがゲー-東洋

セラード粒子に結合する場合、DNANプローブのE、即ち端はまた逆転用のプレイヤーとして作用して一端無機酸 (inorganic acid) DNA (single DNA) を形成することが可能であり、single DNAはその後、希望により、本願出願人の実験報告書第 111151.1号及び第 1112150.1号に対応する本願と同日付けの請求出願（その内容は参考として本明細書中に組み入れられる）に従って、単離したDNANに粗略的な二重鎖DNA (double DNA) を脱離するのに使用できる。1つ以上の側鎖エンドオクレオチドを有するオリゴマーを介してのDNANプローブのE-末端の結合によつて、このプローブ、組みされたDNANは、物理化学的分析によって粒子から離脱することができ、粒子は粗略的に分離される。

しかしながら、本発明の別の実施態様によれば、プローブは粗略的mRNA分子に對して特異的である。

粗略粒子にカップリングされた特異的DNANプローブの使用は、プローブとハイブリッド化する共通の配列を有するmRNA分子の端 (tip) を單離する際に常に効用がある。従って、例えば、免疫グロブリンに対するDNANのヨーダイングは、重い吸と吸い着の一端の端部からDNANプローブを作用して解離する動物エキスから解離できる。地盤的に反復する医療的研究において、遺伝子の保留下れた配列 (target sequence) に対応するプローブを使用して一端の粗略

された粗略粒子から離脱されたmRNAを單離することができる。

2. 一端DNANの単離

水洗脱による選択オリゴメクレオチドは、mRNAの場合と同様に同じ方法で、DNANを單離するのに使用できる。細胞崩壊液のように、DNAがサンプル中に二重鎖の形態で存在する場合、精分离工程が如何に必要である。これについては、後者のオクレック・アンド・ハイブリダシヨンの実験中で認明する。

オリゴ-E プローブを保持する水洗脱の選択粒子は、特定の酸性精製剤 (specific buffer, acidic buffer) の分離に有利に作用することができる。酸性精製剤のように、DNAがサンプル中に二重鎖の形態で存在する場合、精分离工程が如何に必要である。これについては、後者のオクレック・アンド・ハイブリダシヨンの実験中で認明する。

に複製するために、1回以上中ナイクルの複製過程を行うことができる。この技術は、過剰なラベルでラベル付けされた複数の核酸の汚染、結果的分析システムにおける「ノイズ (noise)」との共存問題、を防ぐ点で特に有効である。

8. 一基酸の RNA は DNA の塩基配列決定法

DNA の塩基配列決定には 2 つの主要な方法、即ち、Maxam-Gilbert 法と Biggin ジオキシ法がある。Maxam-Gilbert 法は、1 基の酸の DMS でラベル付けされた DNA を用いて実験する。ラベル付けされた DNA は、その後、4 つのメタクリオチドのうちで選択的に修飾される。条件は、平均して毎 1 本当たり 1 つのみ切断が起こるようを選択される。与えられた条件下での切断角の既知結合場所において、各々の切断された鎖は、DMS からその塩基配列の位置の 1 つまで伸びる特徴性断片を生成し、そのような断片は塩基の全ての位置に対しても同じである。これらの中断片は、例えば、2 本及び 3 本からなるオートジオグラムによって分離される。切断された断片までを組合することによって、全 DNA の配列を決定できる。Maxam-Gilbert 法は、210 塩基以上の配列を決定するのに適用できる。

DNA 塩基配列決定用の Biggin ジオキシ法は、酵素的修復の抑制された細胞に依存する。DNA ポリメラーゼは一基酸 DNA の塩基配列のコピーに適用され

配列を決定する前に、より小さい断片 (150 ～ 550 塩基) に切断しなければならない。通常、配列データを正確に実現するためには、部分的に重なり合う断片が必要である。部分的に重なり合う断片の形成は DNA の配列の決定におけるもう一つの工程を作り出す。

通常使用される塩基配列決定法の 1 つは、DNA 配列カラーンや ESI フラッシュ中で実現するが、これは一回 DNA 5 倍を与える。配列が 150 塩基対よりも長い場合、通常の方法は、初めての部分の塩基配列を決定し、このようにして得られた情報を使用して、次の 50 塩基部分のブライマーを合成し、そしてこの手順を DNA 組合体の塩基配列が決定されるまで繰り返す。しかししながら、テンプレート DNA を含む全ての DNA 物質がゲル上に注入されなければならないので、各回転にクローナー ESI アーチの新しいサンプルを使用する必要がある。因此の大きな片のゲル断片を形成する必要はない、複数の塩基配列決定法に対する要因がある。また、簡単、迅速、かつ自動化につながるような方法に対する要望もある。

本発明のさらにも別の面によれば、一基酸核酸の配列決定方法であって、
(1) 配列決定すべきオリゴスクレオチド (DNA 又は RNA) を保持する複数種の單分散粒子を複数する工程、
(2) (1) 隅子を 4 つのアリコートに分割し、各々のア

表表平4-501859 (7)

る。この台座は、細胞的割合によってプライムされる (primed)。4 種のデオキシリボヌクレオシドトリホスファートに加えて、優液 (urea) 混合物は、それらのうちの 2 つ (dGTP, dATP) の脱水缩合 (desoxynucleoside triphosphate) のうちのいずれか 1 つがラベル付けられる。この混合物は次のホスホジエステル結合を形成するのに必要なジ-ヒドロキシ末端を欠いているので、この混合物の組み込みは厳密さからに成長するのを妨害する。尚って、ジオキシ過酸化が DMS にある様々な長さの断片が形成される。このような断片形成停止 (stop) (dGTP-triphosphate) 断片群の 4 つの組 (各々のジオキシ結合に対応して 1 つずつ) をゲル上で電気泳動させて、4 つのレンジのオートジオグラムから DNA の塩基配列を読み取る。最近、ジオキシ法の技術が発達され、これは蛍光標識細胞のオリゴスクレオチドプライマー、即ち、4 つの連続停止反応混合物の各々の中で別々に着色されたもの、への結合を含む。これらの混合物はまるめて、一側に電子供給者とする。それらが検出器を通過するととき、それらの蛍光によって、DNA の分離したバンドが検出される。この方法では 310 塩基までの配列を決定することができるが、一般に、約 150 塩基のようなより短い配列が好ましい。

DNA のかなり長い配列は、この方法によって複数

リコードに、ポリメラーゼ、組合スクレオシドトリホスファート、及び 1 つのジオキシヌクレオシドトリホスファートを添加する工程であって、ここでジオキシヌクレオシドトリホスファートは各アリコート毎に異なり、プライマーが必要であれば、プライマー又はスクレオシド又はジオキシヌクレオシドの少なくとも 1 がラベル付けされている工程が又は、

① 会社子に、オリメラーゼ、混合スクレオシドトリホスファート。それぞれ異なるラベルを有する 4 つの異なるジオキシヌクレオシドトリホスファート、及び、必要であればプライマーを添加する工程、

を行うことによって、それぞれ固なった細胞と特徴のジオキシヌクレオチドをもつた試験を有する、一連のラベル付けされた DNA 鎮を合成する工程、(i) ラベル付けされた DNA 鎮を複数させ、大まき毎にそれらを分別する工程、及び
(ii) 配列を決定する工程、

を含む方法が提示される。

配列決定される一基酸核酸はオリゴスクレオチドであること、及び工程 (ii) が本発明による所含されたオリゴスクレオチドを有する過量粒子の形成を含んでいることに在りすべきである。配列決定される一基酸核酸がカルドムである場合は、ポリメラーゼは

特許平4-501959 (B)

示するDNAを含み、複数プライマー部位を介して複数端子に結合している一端子を有することができる。

上記のものに対して相補的なプライマーはアユール (Aureol) である。例えば、放射性ラジオチオテトロリオメタセチルオキシド部分を加えアニーリングすることによってラベル付けができる。その後、上で端子を述べたような、サイズ分離を含む配列決定が行われる。配列決定は、通常、わずか約15'の端基に対して実行され、正確なサイズ分別を目的にする。これは、ジオキシシクレオチドのノーマルラジオチドに対する比率を測定することによって達成される。合成されたcDNA断片は、柱上のDNAに巻きこむことなく直接によって検出できる。その後、配列端子は、配列決定されるべき次の二つの端基の組合せのプライマーを観察するために利用できる。このようにして、端子に接するDNA鎖 (例えば、引物端基) が、部分的に、技術的手段によつて合成の端頭に接続することなく、直接配列決定できる。

クローニングベクターに組み入れられているプライマー配列は、簡便には、従来的R1341端基配列決定において使用されている。いわゆる、「ニューバーサルプライマー (universal primer)」である。即ち、引物端子を有する全てのベクターはこのプライマーを有しており、これは、引物端子における配列を有している。

本発明の複数配列決定装置は図4の構成を有すること

DNAポリメラーゼでよく、ヌクレオチドである端子は、デミメラーゼとDNABポリメラーゼか又は逆転写酵素であることに留められるであろう。

サイズ分離時に端子の固定を可能にするために、プライマー配列は、それに結合したラベルを有してもよく、長いジオキシシクレオチドリキスフェート又はジオキシシクレオチドは、例えは、放射性でラベル付けされてもよい。端子端子に結合したランプレート端子とcDNA断片の両方を端子端子とともに前段から逐次的に分離し、cDNA断片を酸性水溶媒液剤中に溶解させることによって、過剰のラベルを束ねる操作できることは、本用明を配列決定法の要領によつてある。從前の配列決定方法においては、端子端子が配列決定ゲルからの後 (100%) を認知していた。

本発明による特に有効な方法の1つは、初めに、配列決定するDNAのクローンをクローニングベクター内で形成させて配列決定用のDNAを十分に標準化する。あらゆる種類のクローニングベクターを使用できる。その後、DNAはベクター中の適当な長さで切断され、慣習的ベクターの結合部分 (これらは既に配列決定されている) を除いて端子端子への結合に適する端子を提供する。

二重鎖DNA端子がジ-ビオチニル化試料を介して端子に結合している場合、それを観察させて、配列決定

ができる。

A、配列決定されるDNA鎖は、ジビオチニル化され、ストレプトアビシンを有する端子端子に結合してもよい。所望により、二重鎖DNAをこのようにして結合させ、その後、端子端子に接続された端子端子に接続して、端子端子が既に別途に配列決定して配列情報の端子を有えることができることは往々である。プライマーはジビオチニル化試料、或いは、上記のジオキシシクレオチド濃度約500道密度でハイブリッド形成し、次の部分を配列決定するために上述したようにプライマーが必須となる。

B、配列決定されるべきDNA鎖は、端子端子に接続されているランカーのハイブリッド形成でき、このランカーは一重鎖DNAのループの形態であり、ここで、引文端がジ-ビオチニル化試料でハイブリッド形成し、DNA鎖のジ-ビオチニル化試料に接続するためには、端子端子が接続する。

このようにループは、アミノ

又はビオチン基を介して端子端子に結合する

ことができる。これらの基は既に接続されたカルボキシル

又はストレプトアビシン基とそれ自身反応する

ことができる。DNA鎖は、ジ-ビオチニル化試料と結合され、その後、ループのジ-ビオチニル化試料に接続してある。

合を与えてもよい。ループによって与えられた名のに対応する粘着性末端を有する二重鎖DNAは、このようにして結合することができ、2つの端子はその後端によって結合でき、5'端子までの第1の部分を配列決定するためのプライマーとしてのループのジ-ビオチニル化試料を有することができる。

C、端子端子は、DNAのある部分に対しハイブリッド形成するプローブを対応することができる。このプローブは第1半部分の配列決定をするためのプライマーとして役立つ。プローブに対しハイブリッド形成するDNA配列は、配列決定されるDNAに割り当てられるのが好ましい。これに、後者のDNAが最初の重鎖DNA配列とともにベクターから切断される場合、共通に起こり得ることである。切断がcRNAの場合、プローブは、既生再構成DNAsのボリヌクレオチド (PNT) に対しハイブリッド形成するジ-ビオチニル化試料でよい。或いは、例えは、cRNAのジ-ビオチニル化試料が既に知られている場合、プローブは、cRNA中のある配列に対しハイブリッド形成する特異的DNAs配列でもよい。

配列決定端子がプライマーにラベルを追跡することを要求する場合、プライマーとしても機能するプローブは、合成されたDNAs端子をラベルとともに端子から切り取れるように、適当な封緘剤を有していないければならない。この製剤は方法2)及び3)の

両方に活用される。しかしながら、グローブに汚物
結合せず洗って白脱された日本人研とともに客室に
分離する、分離レベル化プライマーを單に格用する
ことでもある。

4. ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) による個的遺伝子の増幅
 個的 DNA 分子は、細胞質改善又はその他の要因で常に極めて少量でしか存在しないことが多く、既判決定のためにそのような DNA を選択的に増幅 (amplify) するためには、ポリマー鍵連鎖反応 (PCR) 法を使用してよい。個的 DNA を増幅させるためにはタッピングエンジニアリングを使用するよりもむしろ PCR 法が利用される。PCR 実験においては、個的 DNA の公型の座標に特異的な一対の座標プライマーが選択され、ポリメラーゼの存在下に、各プライマーが標的 DNA テンプレートの全長まで伸びる DNA 配列を生成するように、一方はコーディング側の引文端又はその付近でハイブリッド形成し、他方は非コーディング側の引文端又はその付近でハイブリッド形成する。このようにして生成された DNA がそのまま後、興奮剤には細胞での複数による、所分離処理にさらされる場合、新たに合成した一系の DNA 配列は蛋白質転写中に選択する選択のプライマーに対しハイブリッド形成し、通常アミニーリングに通する範囲まで密度を下げた後、ポリメラーゼの存在下にさらに DNA 鎌が合成されるが、今度は 2 つのプライマーの末端間しか伸びない。ポリメラーゼは、細胞内

4つの別冊のプライマー化を収容することによって
年間販売総合の大略な概要化が達成できる [ムリス
キー、ビー (Mills, B.), L. J., ケー・ラーローネ・ニク
・エ (K. LaRonne, N.), メンツ・イン・エンザ
イモビジー (Menzies in Ensign) (1968) 133-233
~200 頁、英語テキショニク エル・ニ (Technical,
L. N.) を参照。日本版 (1971) II 529~512頁。
を参照]。エンゲルケ ディー・アル (Engelke, D.
E.) は、オリジナルのプライマーの一方に入れ子にな
っている、1つの新しいプライマーのみが、慣用DNA
のより大きくくつより一級した場所をもたらすこ
とができるることを示唆している (Proc. Natl. Acad.
Sci. USA (1968) 65 541~545頁)。

本発明者は、本発明の結合したオフィゴタケレオナドを有する電池乾燥器がDCI 増幅器におけるプライマーの1つとして使用できることを見出した。この反応の過度反応は過度中で見られるものに近い。入れ子になつた第1のアブリマーが使用される場合、本発明の電子干渉子のDCI 增幅において優越することのみが要求される。各々の場合、増幅された全てのD.N.A.は酵素活性上に不動化され、酵素の反応性を除去するために昇温に曝露できる。増幅されたD.N.A.が遺伝に障害であるように、抗体とオフィゴタケレオナドプローブ／プライマーの間に特異性又はその他の可逆的結合を設けるのが好ましい。

特表平4-501959(8)

工場で使用される高級車で生き残りができるのが肝生しく、既存の好熱性ポリマーは、すなわち、TPE-Iが最近利用できるようになった。最初の2つのプライマー及びリバウンド後に必要な過剰のラクリオチドが接着体中に残存される場合、別々の層が重複され、分離され、プライマーまでアニールされ、新しい層が形成され、これらがただ単に上記の既存面に外する疊重構造の形で密度を上させることによって行われる。更に接着アセスを行なうことができる。この方法においては、オリジナル導入した中の増強が接着力を弱めたり、强度の数倍万倍の増加が比較的早い時間で行なうことができる事が判明した。

しかしながら、プライマーがその他のJDNMへの再登録時に既と、それにより前のJDNMに加えてその他のJDNMが署名されることによって、この方針は必ずしも子分に適用的ではない。プライマーの新規登録の場合による、このサンプルJDNMのランダムな複数の構造は、複数JDNMからのシグナルに比較してパックグラウンド中のノイズを強調させる。多くの場合、このパックグラウンドノイズのレベルの増加は、この方法の有用性に大きく影響を与える。

分子クローニングに適用して、このプライマーの非特異的結合の問題が、第1の群のプライマー中にに入れ子になっている母2の群のプライマーを使用することによって解消できると提唱されている。

ビオケニル化ブロープ／プライマーを使用するIEEを行なうこともでき、また培養DNAを平野するためアピタン又はストレプトアピタンで被覆された本発明の固定粒子を使用することもできる。

4. 領域DNAのラベル付けとその分離

高麗紹昌山題第 1137161. 1号に對応する本領と百日
作けの本領出兩人による國際美術化前であつて、その
内容を参考として本研究書中に選み入れられているもの
には、損失復元にラベル付ける方法であつて、
現地所蔵の公知め配列に特徴的なオリゴヌクレオチド
プローブを抱合した環状核子を標的核酸を含む混合物
に添加し、プローブをプライマーとしてポリメラーゼ
及び適当な塩基とともに使用して該核のラベルを行わせ
れたタクタクオナド核苷を結合入れた上記DNAを合成す
る方法が記載されている。この方法は特に簡便で迅速
であり、標的核酸を定量的又は定性的に分析するのに
使用できる。

3. エロハの危険

高齢者歯周病 第1回目は、1号及び第2回目は2号に対応する本研究と同条件での歯周病介入による臨床効果を出典でもって、その内容が参考として本研究中に述べられており、には、オリゴマクレオナドプローブを把持した歯科椅子を軽く横置に拘してハイブリッド化自己、プローブをプライマーとしてオリゴマーゼ及び細菌叢マクレオナド細胞とともに使用して、

特表平4-501859 (10)

cDNA組を合成させることによる、cDNAの合成が記載されている。この方法は、他のcDNA分子を合成するためには、更に複数する特定位の核酸の全てで、例えばRNA中の全てに対応するcDNAを合成するため使用できる。

6. 本発明の属性粒子を使用する方法のためのキット

本発明はまた本発明の方法を実施するためのキットを提供する。

A. サンプル中の全てのmRNAを転写するためのキット

(a) オリゴ-dTを担持した本発明による属性粒子及び1つ以上の

(b) ハイブリッド化装置

(c) 洗浄用緩衝液

B. サンプルから特異的の属性粒子又はcDNAを単離するためのキット

(d) 特異的オリゴヌクレオチドを担持した本発明による属性粒子及び1つ以上の

(e) ハイブリッド化装置

(f) 洗浄用緩衝液

C. DNA又はRNA検査用洗浄用洗浄用のキット

(g) オリゴ-dTは特異的オリゴヌクレオチドを担持した本発明による属性粒子

(h) オリメラーゼ及び1つ以上の

(i) 過酸化物消滅剤

D. DNA又はRNA検査用洗浄用洗浄用のキット

(a) オリゴ-dTは特異的オリゴヌクレオチドを担持した本発明による属性粒子

(b) オリメラーゼ及び1つ以上の

(c) 過酸化物消滅剤

のアミノ官能性を比較して、アルキルリンカーの末端部上アミノ基のより大きな水溶性をもたらす。共て、粒子上のカルボキシル基にこれらの第1アミノ基と個別に反応することが予想された。

100カルボキシル粒子100ナット、0.1M TBS(0.1Mと1中の100 mM) S-EME改質プローブを添加した。反応混合物を瓶やかに振盪しながら室温で1時間育った。

(b) TBS改質プローブをアブライド・バイオシステム・レンセサイマー (Applied Biosystems 3930A) とアミノリンク (Amersham) Eを使用して観察した。

カップリング反応は以下の通りであった。

100カルボキシル粒子100ナット、0.1M TBS(0.1Mと1中の100 mM) S-EME改質プローブ、0.1M TBSを添加した。反応混合物をローラーミキサー [コールター (Carter)] 上、室温で1時間育ち、その後 100ナット (4) を含む緩衝液中で洗浄した。

ハイブリッド形成 (ハイブリダイゼーション) 頃期： 粒子の量の結合したプローブを有するある範囲の粒子を複数個 (25 nM) ハイブリッドプローブを用いてハイブリッド形成実験において検討した。

粒子は、粒子100ナット (0.1M TBS) の結合したプローブをカバーしていた。

25 nM オリゴヌクレオチドの量を徐々に増加

させながら、粒子に結合する量の結合したプローブとハイブリッド形成を観た。100 nMが、結合した100 pmolを有する粒子に附してハイブリッド形成した。しかしながら、標的分子が100 fmolの範囲にあつた場合【財團 法人日本・ブロメガ・コーポレーション (Japan Biomega Corporation)】、結合したプローブを 100 fmol 有する粒子とより密度が高くカップリングした粒子とを比較してもハイブリッド形成率に相違はなかった。

実験例2

カルボサイミド (EDTA) で紹介されたD-ヒスプローブのカルボキシル粒子への結合

(a) プローブのカルボキシル粒子への結合に使用される反応は以下の通りである。チヌク (C6H5) 基によって記載された [(C6H5)3C-COO-] 又はチヌク (C6H5) 基によって記載された [(C6H5)3C-COO-] 及びオーケル (OAc) 基、L-L、(1945) TAA-L、(121～111) 、トエヌク (OAc) を酸用してプローブのD-ヒス端に導入されたアミノ基は、強酸

XMAS デステル (100 μg/ml) を添加して反応を一晩保った。

過剰のラベル付リボヌクレオチドと酸性液を、カファデックス 650 スピントラム (Fisher Scientific 650-1124-0000) 中で洗浄した。

E. coli のポリメラーゼ、E. coli RNA-Polymerase (Sigma P-1750) による反応中のフィル (1ml) を使用して、リビットアンオリゴ (4T)₁₂ を常法ラベル付け (Feinstein et al.) した。過剰のラベルをカファデックス 650 スピントラムを使用して除去した。

オリゴ (4T)₁₂ ダイナビーズ T-ビーズ を調査

4T₁₂ 6 × 10⁻⁶ M 中の 20 μl にビオテニル化オリゴ (4T)₁₂ (4T₁₂-biot) を、10 μl の水で洗浄したダイナビーズ T-ビーズストレプトアビシンを混合し、室温で 10 分間ローラー (キサー上) で振った。

6 × 10⁻⁶ M 中で 2 回洗浄した後、ビーズを 0.1 ml、1.1 M NaCl 中で 4°C で保存した。

オリゴスケレオチドハイブリッド形成分析

T-ビーズの種々のパッチのハイブリッド形成能力を測定するための標準的分析において、エッペンドルフ (Eppendorf) 室中の 0.1 ml のビーズを 6 × 10⁻⁶ M、0.1 M NaCl 中で洗浄した。マグネットタック (MTC-8) でダイナビーズ T-ビーズ (オズロ) を磁石接触した粒子を細胞を含むのに使用した。

洗浄用緩衝液の除去後、50 μg/ml のオリゴ (4T)₁₂ を量 (1 ~ 2 × 10⁻⁷ M) と、(100 μg/ml) ラベル付けオ

特表平4-501959 (12)

リゴ (4T)₁₂ を含むハイブリッド形成液 (0.1 M NaCl、0.1 M EGTA) を添加した。

液やぶに混ぜた後、液を直置で 2 分間放置してハイブリッド形成させた。

ハイブリッド形成した粒子を更に 2 × 10⁻⁶ M、0.1 M EGTA を用いて 2 回洗浄し、オリゴ (4T)₁₂ に対してハイブリッド形成したオリゴ (4T)₁₂ のパーセントモシンチャーション計測器中で測定した。

オリゴ A mRNA トランクリベーリング

オリゴ A チュールを有する 1 × 10⁻⁶ M mRNA (プロメガ) を、10 μl 1 S E. coli mRNA 濃度液、1 μl 20 アシソ (Kinetac), 10 μl EGTA 中の 0.1 M EGTA オリゴ (4T)₁₂ と混合した。空温で 2 分間、10 μl (E. coli T-4) RNA-Polymerase と混合した。室温で 10 分間作用を確認した。過剰の 0.1 M EGTA をカファデックススピントラムを使用して除去した。

オリゴ (4T)₁₂ を原点としたダイナビーズ T-ビーズストレプトアビシンに対するオリゴ (A) mRNA ハイブリッド形成用緩衝液

オリゴ (A) 緩衝液：

0.1 M LiCl、1.0 M ドリス-CI、0.1 M EGTA、0.1 M ドデシル硫酸ナトリウム。

中性洗浄緩衝液：

0.1 M LiCl、1.0 M ドリス-CI、0.1 M EGTA、0.1 M SDS。

此作業的用意を測定するための対照実験において、未標的アロープ (E. coli T-4) ブロープとカップリングした粒子は、粒子 1 mgあたり 10 fmol のオリゴ (4T)₁₂ を未洗浄結合させた。

オリゴスケレオチドとのハイブリッド形成速度論

過剰的に mRNA と单離済液を回転する間に、この系のハイブリッド形成速度論を研究することが必要であった。

粗縫のオリゴ (4T)₁₂ 原点タクレオチドに対する未洗浄結合の T-ビーズハイブリッド形成能力を使用して、ハイブリッド形成速度論を組み立てた。

第 1 回が示すように、ハイブリッド形成は 1 分以内に完了した。

オリゴスケレオチドとのハイブリッド形成速度論

どの程度効率的に制御装置が結合から分離できるかを試験するためには、本発明者は 2 つの異なる実験を組み立てた。

第 1 の実験においては、余分な液を増やしながら数々の量の粗縫のオリゴスケレオチド (オリゴ (4T)₁₂) を、最初の最大ハイブリッド形成能力 (10 fmol) を有する確定量 (100 fmol) の T-ビーズに添加した。第 2 回目の実験は、粗縫のビーズ能力のモル比が 1 : 1 に近づいた場合でも、T-ビーズは少なくとも 10 fmol の粗縫のオリゴスケレオチドと結合できることを示している。

第 2 の実験において、1 fmol から 100 fmol までの 5 つの量じゅうた濃度のオリゴ (4T)₁₂ を 100 fmol の粒子の

特許平4-501958 (13)

ヒトにて別れるポリA RNAのハイブリッド形成 を測定する方法

アリコートに添加した。各混合物中に存する核酸の含量を、核酸側のオリゴヌクレオチドを含むプローブで 10^6 cpmまで調整した。標的オリゴヌクレオチドを含まない既定的对照実験においては、非特異的結合を検知できるように、非特異的プローブをラベル付けした。2分間のハイブリッド形成後、全混合液の洗浄工程を行い、ハイブリッド形成したオリゴ(4nt)の量を算定した。第2回中の所見は、 10^6 cpmのような低い標的オリゴヌクレオチド量(容積に対する濃度の 1/10%)でも、既存オリゴ(4nt)核子は既往以上を引き出すことを示した。

オリゴ A 核酸との複合の量測

(4nt) 5'-ダイナビーズ結合オリA RNA の能力、既往のおよび既往を、オリゴヌクレオチドハイブリッド形成に制して既往したような既往の上級の実験を組み立てるこことによって既往した。

T-ビーズの最大オリA RNAが大結合能力を発揮するために、これまでに 10^6 cpmを有する(200)ヌクレオチドカナマイシン酵素(プロソガ)である公私約の複数のT-ラベル付けされた対照RNAを用いた。結合能力を決定するための方針は、オリゴヌクレオチド結合分析に因して既往したと同様であるが、上述のハイブリッド形成実験を用いた。

この特定のオリA sum RNA の結合能力は、T-ビーズ $1 \mu\text{g}$ 当たり 10^6 cpm(4nt)のRNAであることが判明した。

オーフィーラーの上述の方法を用いて、ハイブリッド化既存系(4nt) 10^6 cpmのT-ラベルから全RNAを抽出した。オリゴ(4nt)核子に対するRNAハイブリッド形成の過度換算、既往のRNAを既往のアーティラベル付けされたマウスの原癌RNA RNAとともに、そして 10^6 cpmのハイブリッド形成既存系中の約1倍過剰のT-ビーズ活性を使用して、測定した。第2回中の結果は、サンプル中のオリA RNA RNAの10倍過ぐる5分以内にビーズに付してハイブリッド形成し、また4分後には95%が既往ハイブリッド形成していることを示している。

既往質的(4nt) RNA からのオリA RNA の直接性質の測定

ハイブリッド化既存系(4nt)の培養液からの 10^6 cpm右の皮脂浮沈し、既往の T-ラベルベッコ(Delivette)、4ml-400ml 中に再分散させ、トリトン X-100を 10^{-5} Mの最終濃度まで溶解した。1分間のリシス(1000 rpm)の後、核酸を含む液体デブリスを、ニッポンドープ(Nippondope)離心分離器中で10秒間スピントしてペレット化した。上清液を、2時間後の4nt ハイブリッド形成既存系中のT-ビーズに加えし、2分間振動してハイブリッド形成させ、その吸光度を既往的に既往させた。ハイブリッド形成したRNAを $2 \sim 30^{\circ}\text{C}$ 中 15°Cで既往から切り離し、既往を既往として既往した。この

実験においては、4nt ハイブリッド化既存のアリコートを、既往量、 100 cpm、 100 nm、 10 pm、 20 pm、のT-ビーズと、プローブなしの4nt RNAのダイナビーズ \times 既往T-ストレートアビシンに添加した。T-ビーズから既往した後、ポリエチレンのノーマンプローブ(4ml-400ml)からのスクリューフィルムをシントスターでスキャンし、既往グロブリンカバ遮蔽プローブで消去した。これらの結果は、RNA RNAの吸光度がビーズの量が増加するとともに増加し、一方上清液中の既往RNAがそれに反応して減少することを示している。第2回中の既往されている既往は、約10%のT-ビーズが4nt 細胞からの細胞質オリA RNA RNAの10%より多くを既往するのに十分であることを示している。図中の記号—△—は既往に対するハイブリッド形成を表し、記号—○—は上清液中に既往しているRNA RNAを表す。プローブを有していないストレートアビシン核子は既往RNA RNA結合を示さなかった。

既往測定

既往 RNA 細胞系(ラサ)(4nt) (スウェーデン、ストックホルムのクーン・カイン研究所(4nt) 2月14日から既往された) からのRNA RNAの測定

オーフィーラーによっては、L. Blocker (1977, 381 ~ 386) に記載されている方法によつて、L-16 培養からRNA RNAを抽出した。この方法によつて、4.1 ml の培養ペレットを、3 ml 氷冷分離液(40% 過酸化水素

1/1000、6 M 塩酸、0.1 M サルコシル(Sarcosyl)、0.1 M 2-メルカプトエタノール、0.1 M ドリス-EGT(1M DTT, 5 mM EDTA) に加えした。その後、混合物を超音波処理し、水上で一物保持した。

翌日、分離液を 1.000 で对外周端心分離した。ペレットを透析中にはT-ストレートアビシン核子、既往 RNA RNA(既往)に溶解させ、同体液のブリノール-クロロカルム(1:1)で上清液出し、その液クロロカルムのみでもう一度漏出出した。分離液を3倍体液のエタノールと $1/10$ 体液の3 M NaAcと混合し、10% バッヂに分散し、そして使用するまで-20°Cで保存した。

L-16 培養に相当するRNA RNAのバッヂの1つに、マニアチスによって(1972年1月～1月)に記載された方法に沿つて、オリゴ T-セルロールを既往する既往のRNA RNA複製法を施した。

RNA RNAのもう1つのバッヂを以下のはRNA複製法において既往した。

D RNA 合成器(アブライド-バイオシステムズ製)によつて製造された、構成(4nt) 10^6 cpm-400ml培養液(4nt)を有するPBI と合せられていてDNAプローブを、4nt のPBI核子、4nt の前既往DNAプローブ、または4nt T-アミドジゾール複製液(4nt 中の40% のEDCシダ酸)と混合することによつて、(前述の)カルボジイミド液によつて既往核子を既往させた。一既往基し、TE(上清のもの)を2回既往

特表平4-501959 (16)

新編

111 呼吸テンプレートを適用する固体相DNA鑑定法
検討

ジテキナシタクレオチドで作成されていない全ての
種の先生なれば、 $1\text{M}\text{M}^{-1}$ の各ヌクレオチドを含む 2
ml のデキナシタクレオチド液瓶、pH 7.0、を加熱し、
15分間室温に保持することによって行った。

5%のホルムアミド溶液を添加し、液槽水中で3分間振動して、粒子からのラベル付けされたDNAを変性させることによって、反応を停止させた。その後、菌子テンプレートを脱気的に分離し、ラベル付けされたDNAを含む5%の上清液を緩慢な均勻吸引装置用アルゴンプロトヨール (Argonflow) に入れだす。

テンプレートを有する理学的洗脳装置専用で、同様に配列規則からもの既存状況付属に基づく新しいブライター用にされる。

最初のプライマーは公知の配列データ、即ち、
5'-TCG-ATG-TTG-CTG-GT-GCT-11G-C-3'に過ぎない。

2つめの手のパーティーリー、この問題から以下で選択
パートは甚づらか。

アラミダニ-2 S-1-1-1CA 1cG-CC1-CCT-CHA-G-T
アラミダニ-3 S-CCC/CCT-CCT-CCA-CCC-CCC-CCC

このうちヨーロッパでは、先駆的立場をとるにあつて、

シス템を用いて、各部位の配列状態が可能である。

対照として、同じ音を使用して同じ発音手の配列検定を行った。同じ結果が得られた。

雌性牡丹子上のストレアトアビションへむビオチンによる不動化の前に標的毛剝をPDI 技によって増幅したことを探して、原本免疫基質判別検定を前に基準を明確した後所に使って行った。合成ヒトアブジインシクリン遺伝子断片を含むプラスミド pET15b(+)をレ_{coli} BL21 (DE3)細胞に変異させ、導入菌体上に広げた。導入されたバクテリアルベクトリット (Transcriptisellit) では…プロニーを取り、pET15b-トリス-ECL、pET15b-ECL、pET15b-MRE、pET15b-EK-YGCL、pET15b-EK-MERLタブトエタノール、及び pET15b-EK-MERLから既成PCR 標記面对其中に吸着させた。サンプルを封筒までそのまま分離加熱し、更温まで冷却した後、上部のECL 標記板、下部の各感光して中央和した。

マルチーリンカー領域の上流側領域（ピオチン-CCATGAT
TACCGATTCTATGAT-3')及び下流側領域（5'-TCCTGTCTCCGTTAC
CAGCTTGCTCATGAT-3')のそれぞれ既報部分を2つ日本
リゴアクレオトドプライマーを使用してPCRを行った。
得られた（スクレーチンのファーストスクレーチン）が
記載しているように毛膜プライマーを実験においてビ
オテニル化した。

便器混合物（111）と曰は、上述のPCB 製造液、即ち、
1LB の各ズテイマー、111 の混合液、111、及び

TEP、長谷川謙氏(日本)の分析物サンプルから取っていった。又施設のTEP-1ポリミターザ(英語のアーマードキル(armored kill))を施加し、オタネ・フロダマブル・ドリップピック(Transcopic dispensable kill (TICK)) TEC-1(テクキ、死因)を使用して、複数サイタル便器を行った。各サイタルは、計画での十分間の観測工程、その累積30秒での2分間毎に日本水に対するプライマー剤であるリシング、及び20秒で十分間のTEP-1ポリミターザによる計画的殺傷を含んだ。反応混合物を1液のパラフィン管でカバーした。計測時間は、混合物を1時以上保持してピクセル品質検査子に導入した。上記を実施し、示差化された2製品ひきざり計で15分毎に計15分間操作するようによって、直射距離に範囲した、不活性化されたサンプルドリップキルを有するアーマード試験装置を組み立てる。TEP-1殺傷度を評定した。

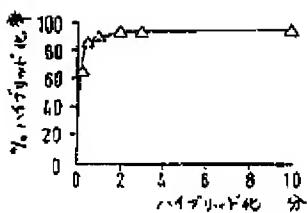


FIG. 1

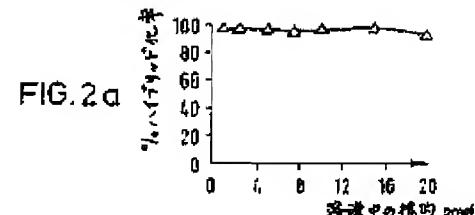


FIG. 2a

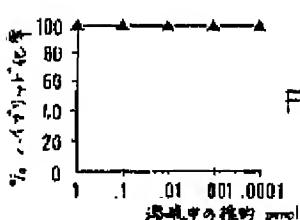


FIG. 2 b

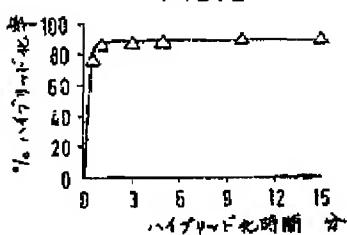


FIG. 3

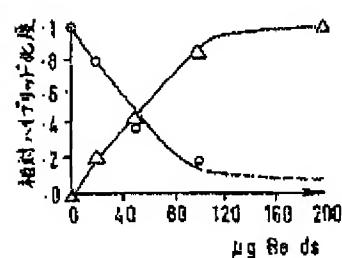


FIG. 4

SEARCHED		INDEXED		MAILED	
Category	Date of Receipt	with Reference No.	Date Received	Reference No.	Date Mailed
X	EP, A, 0281395 (CIEKIN et al.) 7 September 1987 see the whole document				1-8-11
Y					2-7, 19, 20
Z, X	WO, A, 8904471 (DIVERSE INDUSTRIE INC.) 18 May 1989 see the whole document				3, 8-11
Y, Z					2-7, 19, 20
X	WO, A, 8904482 (ADVANCED NANOSTRUCTURE, INC.) 7 September 1989 see the whole document, especially page 1-1, 20, 21; claims 1-7 4 figs, b, 8933040 related to the application				1-8-11
Y					2-6, 11, 19, 30, 32
Z	Nucleic Acids Research, vol. 15, no. 7, 1987, IBM press limited, (Oxford, GB). S. SCHAFF et al.: "Solid phase DNA sequencing using the biotin-streptavidin system". page 3025-3038. see the whole article, especially page 3037, paragraph 1				1-11, 17-20
Y	EP, A, 0310798 (SYNTECH INC.) 5 August 1987 see the whole document				4-11, 19, 20
Z					
Y	EP, A, 0324126 (THE UNIVERSITY OF GOLDSTEIN) 1 July 1987 see the whole document				18, 19-20
Z					

卷四·501353 (97)

SEARCHED		INDEXED	
SEARCHED	INDEXED	SEARCHED	INDEXED
R	US. A. 3,529,774 (COPPER/COPAL ALLOY) 10 June 1968 see page 4,7, column 2,4		1,2-11
	" "		
A	US. A. 3,655,267 (HEPTAETHYL 31 DECEMBER 1971 see abstract, column 7, line 44 - column 8, line 6 (cited in the application)		1
	" "		
A	US. A. 3,655,273 (HEPTAETHYL) 31 June 1972 see abstract, column 7, line 34 - column 8, line 16; example 17 (cited in the application)		1
	" "		
K	Chemical Abstracts, vol. 100, no. 23, June 1984; (COPPER, CHIO, US), J. T. BURKE et al., "Termedial alloys based on copper and magnesium polymer halides", see page 332, abstract 101031a. S WATKINS INC., Ser. 2 1983, 133 (Patent No. 3,653,045, Collected), 156-7D		1-8
	" "		
X	EP. A. 1,132,994 (ADVANCED MAGNETICS, INC.) 12 November 1984 see the above document, especially page 12, lines 26-28		1,8-13
	E US. A. 4,471,848 (cited in the application)		
V			2-7,10-15, 19,20
	" "		
Z	EP. A. 3,030,034 (COPAL COPAL) 10 December 1985 see abstract		16
	" "		

For more information, contact your state's Energy Office.

RECEIVED INFORMATION FROM THE FBI - MEMPHIS REGARDING THE VICTIM		
V	TO, A. 4773423 (CORPORAL EDDY -) 4 October 1968 RE: INCIDENT: BAGNOLIC 3 --	1-12
P,X	TO, A. 80/11546 (C. PATRICK) 16 November 1968 RE: THE VADS INCIDENT --	1-13
T	TO, A. 48-09281 (M. VOLMER) 1 October 1968 RE: THE VADS INCIDENT --	1-19

卷之三

The present invention relates to the use of magnetophoretic superparamagnetic particles associated with a plurality of organic acid molecules in hydrodissolution reactions. For the subject matter to form a unitary concept, it would be necessary that the general inventive concept as detailed should not have been disclosed in the prior art. In this regard, the general problem underlying the invention is to provide a method which can be readily found in the state of art as illustrated by U.S. 3,635,344. This document teaches the use of superparamagnetic particles associated with at least one organic acid group molecule and which are capable of substantial homogeneous dispersion within a carrier medium. The teachings are directed to a particle having a diameter of about 1 micron, see page 4, lines 15-44, and page 6, lines 7-16. By description, the particle is capable of substantial homogeneous dispersion, U.S. 3,642,474 amply describes a suspension whose properties are substantially uniform in nature, i.e., the dispersion comprising substantially uniform particles having a diameter of about 1 micron in accordance with the lexical sense of substantially homogeneous. Thus U.S. 3,642,474 defines particulate whose qualitative properties fall within the scope of these defined herein. The quantitative characteristics of U.S. 3,642,474 are not described in detail. Indeed, in U.S. 3,635,344 and U.S. 3,642,474, both of which are incorporated in the application by reference and requested in the search report, the term *microdisperse* is used loosely to describe particles having approximately the same size, for instance a standard deviation of less than 10% of the mean size, i.e., in U.S. 3,635,344, see page 6, lines 42-47; in example 12, line 44; the term *microdisperse* is used for particles having a standard deviation of 10%. Therefore, the diverse solutions proposed for the problem (previously known and resolved) no longer conform to a common inventive concept. The search has been reinitiated, as a result, to the first target described.

特表平4-501959 (18)

國家圖書獎告

四 8103419

四庫四部總錄

५१
२०१४-१५

The Senate Select Committee on Intelligence, commonly known as the Senate Intelligence Committee, has been investigating the Russian interference in the 2016 presidential election since January 2017. The Committee's work is continuing in the 115th Congress, which began on January 3, 2017.

Item Number and Description	Purchaser Name	Purchase Order Information		Purchase Date Entered
		Order No.	Order Date	
CH-A-# 0255414	JF-A-	11-A-	05040707	27-12-98
		JF-A-	65101528	02-01-99
		JF-A-	65101772	02-01-99
				20-04-98
EP-A-# 0303310	GT-CB-#8	11-B-	1454908	25-07-98
		JF-A-	05040708	02-01-99
		GT-A-	05040709	02-01-99
HD-A-# 0364573	11-B-	11-B-	2700000	01-01-99
		JF-A-	05040709	02-01-99
		JF-A-	05040710	05-12-98
		JF-A-	05040711	05-12-98
YJ-A-# 04215621	07-04-00	11-A-	4654400	10-11-95
		JF-A-C	1254000	10-11-95
		JF-A-C	0515000	22-11-1991
		JF-A-C	0515000	14-12-98
		JF-A-C	0515000	02-12-98
		JF-A-C	0515000	22-01-97
		JF-A-C	0515000	01-03-97
		JF-A-C	0515000	02-03-97
		JF-A-C	0515000	02-03-97
SP-A-# 0230798	95-11-01	11-B-	613260	11-01-99
		JF-A-	05040709	02-01-99
		JF-A-	05040710	02-01-99
		JF-A-	05040711	02-01-99
SP-A-# 0230219	93-05-07	JF-A-	5131920	11-03-99
WD-A-# 0303312	20-03-00	11-B-	3200110	21-03-99
UL-A-# 4644207	02-03-02	11-B-	5105170	16-06-95
		JF-A-	1266000	22-11-93
		JF-A-B	0506013	02-06-94
		JF-A-B	05060130	06-01-93
		JF-A-B	05060130	07-06-94
		JF-A-B	2400000	21-02-98

For more details, please click [here](#) or contact [Customer Support](#) at 800-338-7272.

For more stories like this one, or to become a subscriber of the Beaumont Star, visit [beaumontstar.com](http://www.beaumontstar.com).

毎1頁の廣告

Chit. Cl.

卷之四

疗內整理番号

C 12 9

2 6307-4B

卷之三

© 2014 Pearson Education, Inc.

1988年11月21日西イギリス、GB A6827159.8
電気炉の炉内温度監視装置

1988年11月21日第4車りえ(GB) 00827100.6

©1988年11月21日 サイクリス(GB) 03827186.3

©1988年1月21日イギリス(GB)08827167.1

©1988年3月22日イギリス(CB)08936843.5